

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



549703

(43)国際公開日
2004年9月30日 (30.09.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/083419 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 9/06, 15/53, 15/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12Q 1/26, C12M 1/40, G01N 27/30, 27/48
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003587
- (22) 国際出願日: 2004年3月17日 (17.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-116348 2003年3月17日 (17.03.2003) JP
- (71) 出願人および
(72) 発明者: 早出 広司 (SODE, Koji) [JP/JP]; 〒1520013 東京都目黒区南1-13-16 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 田中 玲子, 外 (TANAKA, Reiko et al.); 〒1006036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: FRUCTOSYLMINE OXIDASE

(54)発明の名称: フルクトシルアミン酸化酵素

WO 2004/083419 A1

(57) Abstract: It is intended to disclose a novel fructosylamine oxidase originating in a yeast *Pichia* sp. and a gene encoding the same. The fructosylamine oxidase can be produced by transforming a microorganism by a recombinant vector having a DNA fragment containing the above gene integrated thereto and culturing the thus obtained recombinant. The fructosylamine oxidase thus produced oxidizes fructosylvaline as a substrate and, therefore, is usable in analyzing fructosylvaline. An assay kit and an enzyme sensor using this fructosylamine oxidase are useful in assaying glycohemoglobin.

(57) 要約: 新規な酵母 *Pichia* sp. 由来フルクトシルアミン酸化酵素ならびにこれをコードする遺伝子が開示される。この遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターにより微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、フルクトシルアミン酸化酵素を製造することができる。製造されたフルクトシルアミン酸化酵素はフルクトシルバリンを基質として酸化することから、フルクトシルバリンの分析において用いることができる。本発明のフルクトシルアミン酸化酵素をもちいた測定キットおよび酵素センサーは糖化ヘモグロビン計測に有用である。

明細書

フルクトシルアミン酸化酵素

技術分野

5 本発明は、新規なフルクトシルアミン酸化酵素（F A O）に関する。より詳細には、本発明は新規微生物の產生するフルクトシルアミン酸化酵素、ならびにその製造に関する。また、本発明はフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子、該F A Oをコードする遺伝子断片を組み込んでなる組み換えベクター、該組み換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を培養することによるF A Oの製造方法に関する。また、本発明は、本発明によって生産されるフルクトシルアミン酸化酵素を用いたグリコアルブミン、フルクトサミン、HbA1c およびフルクトシルバリン計測キットならびにセンサーに関する。

背景技術

15 蛋白質主鎖および側鎖のアミノ基はグルコースなどの還元糖の還元末端と非酵素的に結合して、アマドリ化合物すなわち糖化蛋白質を生ずる。血中においては、ヘモグロビンが糖化されて糖化ヘモグロビン（グリコヘモグロビン；H b A 1 c）を生ずることが知られている。糖尿病患者では健常人に比べてヘモグロビンに対するH b A 1 c の存在比率が高いこと、およびH b A 1 c の血中濃度は過去数週間の血糖値を反映することから、H b A 1 c 血中濃度は糖尿病の診断および糖尿病患者の血糖コントロールの指標として、臨床試験において極めて重要である。

H b A 1 cにおいては、ヘモグロビンβ鎖のN末端のバリンにグルコースが結合していることから、フルクトシルバリンをH b A 1 c の低分子モデル化合物として用いることができる。すなわち、フルクトシルバリンに対して特異性を有する酵素を用いて、H b A 1 c をアッセイすることが可能である。

これまでに、種々の菌株からアマドリ化合物に対して作用する酵素が単離されており、これらの酵素を用いてグリコアルブミン、H b A 1 c およびフルクトサミン等の糖化蛋白質を分析しうることが示唆されている（特開昭61-2681

78、特開昭61-280297、特開平3-155780、特開平5-192
193、特開平7-289253、特開平8-154672、Agric. Biol.
Chem., 53(1), 103-110, 1989、Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338, 1991、J.
Biol. Chem., 269(44), 27297-27302, 1994、Appl. Environ. Microbiol., 61(12),
5 4487-4489, 1995、Biosci. Biotech. Biochem., 59(3), 487-491, 1995、J. Biol.
Chem., 270(1), 218-224, 1995、J. Biol. Chem., 271(51), 32803-32809, 1996、J.
Biol. Chem., 272(6), 3437-3443, 1997)。

本発明は、フルクトシルバリンと反応しうる新規フルクトシルアミン酸化酵素の構造遺伝子をクローニングし、さらにアミノ酸配列を明らかにすること、およびその情報に従い組換えDNA技術を用い該酵素の製造方法ならびにこれを用いる分析方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは上記目的を達成するために種々検討した結果、新規なフルクトシルアミン酸化酵素(FAO)をコードする遺伝子をクローニングすることに成功して、本発明を完成した。さらに、フルクトシルアミン酸化酵素(FAO)をコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターにより微生物を形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、該培養物からFAOを採取することによってFAOを大量生産できることを見いだした。

すなわち本発明はFAOをコードする遺伝子を含むDNA断片を組み込んでなる組み換えベクターで微生物を形質転換することによって得られることを特徴とする形質転換体を培養して培養物からFAOを採取することを特徴とするFAOの製造方法である。

本発明は以下の(a)または(b)のフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質である。

- (a) 配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) アミノ酸配列(a)において、1もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質。

また本発明は以下の(a)または(b)の蛋白質であるフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子である。

- (a) 配列表・配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質；
- (b) アミノ酸配列(a)において、1 もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質。

また本発明は以下の(c)または(d)の配列であり、フルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子である。

- (c) 配列表・配列番号 2 に記載された塩基配列からなる DNA；
- (d) 上記(c)の配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA。

また本発明は配列 GlyPhePhePheGluAlaAspGluAsnAsnGluIleLys を含むフルクトシルアミン酸化酵素である。

本発明は以下の e)～h) のいずれかの配列を有することを特徴とするフルクトシルアミン酸化酵素である。

- e) PheHisTyrAspTyrValAlaProLeuAlaLysProAsnSerLysGluArg
- f) AspAlaProLeuLeuHisAspLysGluTyrTyrGluGluLeuGlnLys-
-AsnGlyLeuArgAsnTyrArgTyrIleSerThr
- g) ThrLysGlyAspLysGlyLeuAspProGluAspLys
- h) TrpValSerValGluAsnProThrProHisLysLeuGlu

本発明はまた、本発明フルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子を含有する組み換えベクター、およびこの組み換えベクターで形質転換した形質転換体または形質導入体を提供する。

本発明はまた、上述の本発明の形質転換体を培養して、該培養物からフルクトシルアミン酸化酵素を採取することを含む、フルクトシルアミン酸化酵素の製造方法、ならびにこの方法により製造されたフルクトシルアミン酸化酵素を提供する。

別の観点においては、本発明は、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用い

ることを特徴とする、フルクトシルアミン化合物類、フルクトサミン、グリコアルブミン、フルクトシルバリンおよびHbA_{1c}の分析方法を提供する。分析は、分光学的にまたは電気化学的に行うことができる。好ましい態様においては、本発明は、フルクトサミン、グリコアルブミン、HbA_{1c}をアッセイする方法であって、試料中のフルクトサミン、グリコアルブミンあるいはHbA_{1c}を分解してフルクトシルバリンをはじめとするフルクトシルアミン化合物を生成し、前記フルクトシルバリンを本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて分光学的に分析することを含む方法を提供する。本発明はまた、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を含む、フルクトシルバリンアッセイキットおよびHbA_{1c}アッセイキットを提供する。

別の観点においては、本発明は、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素が固定化されている酵素電極、ならびにこの酵素電極を作用電極として含む酵素センサーを提供する。

15 図面の簡単な説明

図1は、*Pichia* sp. N1-1 株由来フルクトシルアミン酸化酵素のアミノ酸配列ならびに遺伝子配列を示す。アミノ酸配列は配列表・配列番号1に対応し、遺伝子配列は配列表・配列番号2に対応する。

図2は、*Pichia* sp. N1-1 株由来フルクトシルアミン酸化酵素のアミノ酸配列を示した配列表・配列番号1を示す。

図3は、*Pichia* sp. N1-1 株由来フルクトシルアミン酸化酵素の遺伝子配列を示した配列表・配列番号2を示す。

図4は本発明に用いられたPCRプライマーを表す。

図5は発現ベクターpTN1を表す。

図6は組換えFAOの大腸菌での生産を表す。

図7は組換えFAOの電気泳動写真を表す。

図8は組換えFAOの活性と基質特異性を表す。

発明の詳細な説明フルクトシルアミン酸化酵素

これまでに酵母および *Pichia* 属からのフルクトシルアミン酸化酵素の構造遺伝子の報告はない。したがって本酵素の構造遺伝子、アミノ酸配列は新規であり、

- 5 その組み換え DNA 技術を用いた製造方法は新規方法である。

遺伝子の調製方法

本発明の FAO をコードする遺伝子を含む DNA 断片は FAO 生産菌から得る
ことができる。該 FAO 生産菌としては例えば *Pichia* 属の種々の株を用いるこ
10 とができる、特に *Pichia pastoris* が適している。

さらに本発明の FAO をコードする遺伝子を含む該 FAO 生産菌としては
Pichia acaciae, *Pichia alni*, *Pichia ambrosiae*, *Pichia Americana*, *Pichia amylophila*, *Pichia angophorae*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia barkeri*, *Pichia besseyi*, *Pichia bimundalis*, *Pichia bispora*, *Pichia bovis*,
15 *Pichia burtonii*, *Pichia cactophila*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulate*, *Pichia castillae*, *Pichia chambardii*, *Pichia ciferrii*, *Pichia delftensis*, *Pichia deserticola*, *Pichia dianae*, *Pichia dorogensis*, *Pichia dryadoides*, *Pichia etchellsii*, *Pichia euphorbiae*, *Pichia euphorbiiphila*, *Pichia fabianii*, *Pichia farinose*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia fluxuum*, *Pichia 20 galeiformis*, *Pichia glucozyma*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia hampshirensis*, *Pichia haplophila*, *Pichia hawaiiensis*, *Pichia heedii*, *Pichia heimii*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia inositovora*, *Pichia jadinii* (*Torula yeast*), *Pichia japonica*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kodamae*, *Pichia lachancei*, *Pichia lynferdii*, *Pichia maclurae*, *Pichia mansjurica*, *Pichia media*, *Pichia membranifaciens*,
25 *Pichia methanolica*, *Pichia methylivora*, *Pichia mexicana*, *Pichia meyeriae*, *Pichia minuta*, *Pichia mississippiensis*, *Pichia misumaiensis*, *Pichia naganishii*, *Pichia nakasei*, *Pichia nakazawae*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ofunaensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia onychis*, *Pichia petersonii*, *Pichia philodendra*, *Pichia phlogaea*, *Pichia pijperi*, *Pichia pilisensis*, *Pichia pinus*,

Pichia populi, Pichia pseudocactophila, Pichia pseudopastoris, Pichia quercuum, Pichia rabaulensis, Pichia ramenticola, Pichia rhodanensis, Pichia salicis, Pichia salictaria, Pichia scolyti, Pichia segobiensis, Pichia silvicola, Pichia spartinae, Pichia sporocuriosa, Pichia stipitis, Pichia strasburgensis,

- 5 Pichia subpelliculosa, Pichia sydowiorum, Pichia tannicola, Pichia toletana, Pichia trehaloabstinentis, Pichia trehalophila, Pichia triangularis, Pichia veronae, Pichia wickerhamii, Pichia xylosa, Pichia zsoltii 等の酵母をあげることができる。

該 FAO をコードする遺伝子はこれらの菌株から抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらに PCR 法の利用により FAO 遺伝子を含む DNA 断片を得ることができる。

上記 FAO をコードする遺伝子としては、例えば (a) 配列表・配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする遺伝子、または (b) アミノ酸配列 (a) において 1 もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ FAO 活性を有するタンパク質である FAO をコードする遺伝子が挙げられる。

さらに、(c) 配列表・配列番号 2 に記載された塩基配列からなる DNA、または (d) 上記 (c) の配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつ FAO 活性を有するタンパク質をコードしている DNA がある。

本発明において、FAO をコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えば染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いて DNA を切断したものと、リニアーナーな発現ベクターと両 DNA をの平滑末端または付着末端において DNA リガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、FAO をコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。

次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターから FAO をコードす

る遺伝子を採取することができる。例えば、遺伝子供与体である染色体 DNA は、具体的には以下のようにして採取される。

該遺伝子供与微生物を例えれば 1 ～ 3 日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることにより FAO 遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

上記のようにして得られた溶菌物から DNA を分離精製するには、常法に従つて、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リポヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

微生物から分離、精製された DNA を切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用する II 型制限酵素が適している。

クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えば *Escherichia coli* を宿主微生物とする場合には Lambda gt10、Lambda gt11 などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、*Escherichia coli* を宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC18, pUC118, pUC19, pUC119, pTrc99A, pBluescript, pET28 あるいはコスミドである SuperCosI などが例示される。

クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるのであれば特に制限されない。一般的には、*Escherichia coli* DH5 α , XL-1BlueMR, *Escherichia coli* BL21 などを用いることができる。また本酵素が酵母 *Pichia* 由来であることから、*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastorius* などの真核微生物を宿主として用いることができる。

宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物が

Escherichia coli の場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレーション法などを用いることができる。

上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の FAO を安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とする DNA を保持するベクターの薬剤耐性マーカーと FAO 活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつ FAO を生成する微生物を選択すればよい。

また別の観点においては単離精製された FAO のアミノ酸配列を決定し、その情報をもとに該菌株から調製した cDNA およびゲノム DNA から FAO 構造遺伝子をクローニングすることもできる。

N1-1 株の cDNA の調製は、例えば以下のようにして行うことができる。まず、N1-1 株から mRNA を抽出する。 N1-1 株を YM 培地で前培養(30°C、5ml、L 字管)後、 fructosyl valine:FV(終濃度 0.48%)を唯一の窒素源として加えた M9 最小培地(M9/FV)に 1 % 植菌した(初期濃度 0.01、30°C、100ml、500ml バッフル)。OD₆₆₀=3 付近で集菌(5,000g、15min、4°C)後、200 μl buffer A (1M ソルビトール、100mM EDTA、14mM メルカプトエタノール) を加え懸濁する。 20 μl ザイモリエイス溶液(1000U ザイモリエイス/1ml buffer A)を加え混和後、30°C、30min 静置する。遠心 (15,000rpm、10min、4°C) 後、沈殿を ISOGEN 1ml により懸濁し、室温、5min 静置する。0.2ml のクロロホルムを加え混和後、室温、3min 静置する。遠心 (15,000rpm、15min、4°C) 後、水相に 0.5ml イソプロパノールを加え混和し、室温、10min 静置する。遠心 (15,000rpm、10min、4°C) 後、沈殿に 1ml 70% エタノールを加え混和する。遠心 (15,000rpm、5min、4°C) 後、沈殿を 15min 真空乾燥する。ここで得られた mRNA をから該 cDNA を合成できる。

すなわち、mRNA をもとに RT-PCR による cDNA を調製する常法において FAO 構造遺伝子を含む断片の増幅が行える。まず、mRNA に対して、RNA-PCR kit (AMV Ver.2.1 takara) のマニュアルに従い、オリゴ dT アダプタープライマーを用い逆転写反応を行う。得られた cDNA をエタノール沈殿法により

精製後、これをテンプレートとして PCR を行う。PCR プライマーには、既報の FAODs の保存配列よりデザインした FAO-F1 と、N1-1 株由来 FAOD のアミノ酸配列解析より得られたアミノ酸 13 残基よりデザインした FAO-R2 を用いることができる。

- 5 FAO-F1 5'-GGXACXTGGGGXWSXWSXACXGCXYTXCA-3'
FAO-R2 3'-TCYTCRTYXGGYTCVAWRAARAAXCC-5'
ただし S=C+G Y=C+T R=A+G X=A+C+G+T W=A+T V=A+C+G
これを以下の反応条件で PCR 増幅を行う。

10 94°C 1 分
60°C 30 秒
72°C 30 秒
以上を 1 サイクル
98°C 30 秒
60°C 30 秒
72°C 7 分
72°C 8 分
以上を 25 サイクル

- Taq ポリメラーゼは、TaKaRa LA *Taq*™などを用いることができる。このようにして得られた PCR 産物を GENE CLEAN II Kit 付属のマニュアルに従いグラスミルク精製後、pGEM-T Vector System 付属のマニュアルに従いサブクローニングし、カラーセレクションにより、インサートを有するベクターを保持する形質転換体を得る。得られた形質転換体を LB 培地で培養(37°C、1.8ml、試験管)し、集菌、プラスミド抽出を行う。得られたプラスミドを M13 プライマーフォワード、M13 プライマーリバース(タカラバイオ(株))を用い、インサートの塩基配列解析を行う。サンプルの調整方法、解析法などは、例えば、ABI プリズム 310 ジェネティックアナライザー(パーキンエルマーアプライドバイオシステム社)付属のマニュアルにしたがうことができる。

次に、C 末端付近の塩基配列を解析するために PCR を行う。前項で得られた精製後の cDNA をテンプレートとして PCR を行う。PCR プライマーには、イ

ンサートの塩基配列解析から得られた配列よりデザインした FAO-F3 と、アダプタープライマー配列を用いることができる。

FAO-F3 : 5'-ATTTCAAAGTGACGGATGAAGAAGCTAAAG-3'

adapter primer : 3'-CGCAGTTTCCCAGTCACGAC-5'

- 5 このようにして得られた cDNA より求められた FAO の内部部分配列情報をもとに、N1-1 株のゲノム DNA を鋳型としてインバース PCR によって、本酵素の構造遺伝子全長をクローニングできる。

N1-1 株からのゲノム DNA は、例えば以下のように抽出することができる。

- 10 N1-1 株を YM 培地で培養(30°C、100ml、300ml バッフル)後、25ml 培養液に対し、25ml エタノール、1ml 0.5M EDTA を加え、-30°C、30min 静置する。集菌(5,000G、15min、4°C)後、1ml 滅菌超純水を加え懸濁する。遠心(8,000rpm、5min、4°C)後、沈殿に 0.5ml スフェロプラスト buffer(1.2M ソルピトール、0.1M EDTA、1% メルカプトエタノール、0.1% ザイモリエイス)を加え懸濁し、37°C、30min 静置する。0.5ml Proteinase K buffer(50mM EDTA、15 0.3% SDS、0.01% proteinase K)を加え混和後、65°C、30min 静置する。0.2ml の 5M 酢酸カリウムを加え混和後、氷上にて 10min 静置する。遠心(10,000rpm、15min、4°C)後、上清を用いてエタノール沈殿法を行い、沈殿を 15min 真空乾燥する。沈殿を 500 μl の TE buffer(10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)に溶解後、5 μl の RNase を加え混和し、37°C、20 30min 静置する。その後フェノール・クロロホルム抽出法、エタノール沈殿法を行う。沈殿を真空乾燥後、1ml 滅菌超純水に溶解する。

- 25 このようにして得られた N1-1 株由来ゲノム DNA に対してインバース PCR による FAOD 構造遺伝子断片の増幅が行える。得られたゲノム DNA を制限酵素消化後、DNA Ligation Kit Ver.2 付属のマニュアルに従い、セルフライゲーションを行う。得られた環状 DNA をテンプレートとし、PCR を行う。プライマーには FAO 構造遺伝子の部分配列よりデザインしたプライマー FAO-F5 及び FAO-R6 を用いる。

FAO-F5 5'-GTGCATACGAAGAACGATTGGGAGTGG-3'

FAO-R6 3'-CCATCCGTTATCTCCGTCGAGAACATATCCTC-5'

これを以下の反応条件でPCR增幅を行う。

94°C 1分

60°C 30秒

72°C 30秒

5 以上を1サイクル

98°C 30秒

60°C 30秒

72°C 7分

72°C 8分

10 以上を25サイクル

Taqポリメラーゼは、TaKaRa LA *Taq*™などを用いることができる。このようにして得られたPCR産物を再び精製し、その塩基配列を常法に従い解析する。

このようにして得られるPCR增幅断片の塩基配列を解析することにより目的遺伝子が得られる。これらの情報から得られたFAO遺伝子配列情報をもとに、
15 この全長断片を含む遺伝子をN1-1ゲノムDNAからPCR增幅により調製できる。すなわち、同遺伝子領域を含む配列を増幅するために

FAO-NcoI : 5'-ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-XbaI : 3'-TTGATTCTAGACATGTATGTTGTAATCTTG-5'

をデザインした。これらを上記のPCRサイクルによって反応することにより、

20 目的断片を含むゲノムDNAを増幅できる。

反応条件は以下のサイクルで行う。

94°C 5分

94°C 30秒

55°C 30秒

72°C 1分

72°C 5分

} 25サイクル

25

上記の方法により得られたFAO遺伝子の塩基配列は、常法により全自动塩基配列解析装置により解読して確認する。また、FAOのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定することができる。

上記のようにして、一度選択された FAO 遺伝子を保有する組換えベクターより、微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、FAO 遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素や PCR 法により FAO 遺伝子である DNA を回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレーション法などを用いることができる。

また、大腸菌をもちいて N1-1 株由来 FAO の組み換え生産がおこなえる。得られた N1-1 株由来 FAOD の構造遺伝子配列情報から N 末端、C 末端に相補的なプライマーをデザインする。この際、N 末端側のプライマーには *Nco* I (FAO-*Nco* I)、C 末端側のプライマーには *Xba* I (FAO-*Xba* I) を付加する。

FAO-*Nco*I : 5'-ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-*Xba*I : 3'-TTGATTCTAGACATGTATGTTGTAATCTTG-5'

上記記載の方法により得られた cDNA、あるいはゲノム DNA をテンプレートとし、上記のプライマーを用いて PCR により FAOD 構造遺伝子を増幅する。

得られた PCR 産物を *Nco* I、*Xba* I 消化し、同制限酵素消化した高発現ベクター pTrc99a(Invitrogen 社)とライゲーション(DNA Ligation Kit Ver. 2)して、プラスミド (pTN1) を作成できる。このようにして作成された pTN1 を大腸菌に形質転換することにより、組み換え FAOD の生産が行える。

20 組み換え FAOD の製造

形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

例えば pTN1 を用いて大腸菌 DH5 α を形質転換し、LB 培地により培養(30°C、25 150ml、バッフル、アンピシリン 50 μ g/ml)後、OD₆₆₀=0.7 付近で IPTG(終濃度 0.3mM)を加える。その後、培養温度を 30°C に下げ、1 時間ごとに 2ml ずつ集菌する。得られた菌体を超音波破碎し、破碎液上清を用いて FAOD 活性測定を行い、Lあたりの生産量 (U/L culture) を算出する。測定には FV(2mM)、PPb(pH 7.0、50mM)、Phenol(1.5mM)、4 アミノアンチピリン(1.5mM)、ペル

オキシダーゼ(2U/ml)を用いて POD/Phenol/4A.A.法により 505nm の吸光度の変化を測定することにより行う。

組み換え FAO の精製は以下のように行える。まず、組み換え大腸菌から該酵素を含む水溶性画分を調製する。pTN1/DH5 α を LB 培地により培養(37℃、71, 5 10l ファーメンター、アンピシリン 50 μ g/ml)し、OD₆₆₀=0.7 付近で IPTG(終濃度 0.3mM)によりインダクションをかけ、培養温度を 30℃に下げる。得られた菌体を 100mM PPb (pH7.0) に懸濁し、フレンチプレスにより 4 回破碎を行う。破碎液上清を超遠心(40,000g、90min)し、上清を 10mM PPb (pH7.0)により一晩、4℃にて透析し、水溶性画分を調製できる。さらに、得られた水溶性画分を 10 以下のように液体クロマトグラフィーに供することにより、精製酵素を調製できる。

まず、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-5PW) を行う。10mM PPb (pH7.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム DEAE-5PW (5.0mm I.D.×5cm、トーソー (株)) に、得られた水溶性画分を吸着させる。 15 カラム容量 3 倍量の 10mM PPb (pH7.0) で平衡化した後、0.7M の NaCl を含む 10mM PPb (pH7.0) で FAOD を溶出させる。流速は 1ml/min とし、一分ごとに溶出液の回収を行う。溶出物の検出には 280nm の吸光波長を用いる。得られた活性画分を 35% 硫安分画後、上清を次の疎水クロマトグラフィーに供する。35% 硫酸アンモニウムを含む 10mM PPb (pH6.5) で平衡化した疎水カラムクロマトグラフィー用充填カラム Resource Phe(1ml、ファルマシア(株))に、上記記載の活性画分を吸着させる。カラム容量 3 倍量の 35% 硫酸アンモニウムを含む 10mM PPb (pH6.5) で平衡化した後、10mM PPb (pH6.5) を用いて 20 FAOD を溶出させる。流速は 2ml/min とし、1 分ごとに溶出物の回収を行う。得られた活性画分を 45% 硫安分画後、沈殿を 1% マンノース、100 μ M FAD を含む 10mM PPb (pH7.0) に溶解後、同緩衝液により 6 時間、4℃にて透析を行う。さらに 100 μ M FAD を含む 10mM PPb (pH8.0) により 6 時間、4℃にて透析を行う。透析後のサンプルを次の陰イオン交換クロマトグラフィーに供する。 25 10mM PPb (pH8.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム Bioasit Q (4.6mm I.D.×5cm、トーソー (株)) に、上記で得られたサンプル

を吸着させる。カラム容量3倍量の10mM PPb (pH8.0) で平衡化した後、0.3M の NaCl を含む 10mM PPb (pH7.0) で FAOD を溶出させる。流速は 1ml/min とし、一分ごとに溶出液の回収を行う。得られた活性画分を 10mM PPb (pH7.0)により、一晩、4°Cにて透析する。このようにして得られた試料の精製度は SDS/PAGE により検定できる。ファストゲル 8 - 25 を用いて電気泳動を行い、サンプル泳動後のゲルを銀染色する。サンプルの調製方法、泳動法、染色方法は Phast SystemTM付属のマニュアルにしたがうことができる。

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して製品とすることが可能である。

10

フルクトシルアミンアッセイキットおよびセンサー

本酵素を用いてフルクトシルバリン計測キットを構築できる。キットは、本発明に従うフルクトシルアミン酸化酵素に加えて、計測に必要な緩衝液、適当なメディエーター、および必要な場合にはペルオキシダーゼ等の酵素、キャリブレーションカーブ作製のためのフルクトシルバリンもしくはその誘導体の標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従うフルクトシルアミン酸化酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

さらに本発明の酵素を用いてはフルクトサミン、グリコアルブミン、あるいは HbA1c アッセイキットを構築できる。フルクトサミン、グリコアルブミン、あるいは HbA1c を酵素的または化学的に分解することによりフルクトシルバリンをはじめとするフルクトシルアミン化合物が生成し、これを本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて定量することによりフルクトサミン、グリコアルブミン、あるいは HbA1c をアッセイすることができる。したがって、本発明のフルクトサミン、グリコアルブミン、あるいは HbA1c アッセイキットは、上述のフルクトシルバリン計測キットにさらに加水分解試薬または蛋白質分解酵素を含む。

また、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて、フルクトシルバリン計測用センサーおよびフルクトサミン、グリコアルブミン、あるいは HbA1c 計

測用センサーを構築できる。すなわち、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素の作用により消費される酸素または発生する過酸化水素を計測することにより、基質であるフルクトシルバリンをはじめとするフルクトシルアミン化合物の濃度を決定することができる。酸素または過酸化水素を測定する種々のセンサー系が当該技術分野において知られている。電極としては、酸素電極、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、これらを組み合わせて用いてもよい。

酸素電極を用いる場合には、電極表面に本発明の酵素を固定化して、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。ここに試料を加えて電流の減少値を測定する。カーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する場合には、作用電極として酵素を固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、メディエーターを含む緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、ルテニウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。

さらにカーボン電極、金電極、白金電極などを用いてアンペロメトリック系で測定する方法として、固定化電子メディエータを用いる系がある。すなわち、作用電極として酵素およびフェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどの電子メディエータを吸着あるいは共有結合法により高分子マトリックスに固定化したこれらの電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）とともに、緩衝液中に挿入して一定温度に保持する。作用電極に一定の電圧を印加し、試料を加えて電流の増加値を測定する。

フルクトサミン、グリコアルブミン、あるいはHbA1c計測用センサーとして用いる場合は、上述のフルクトシルバリン計測用センサーに、さらに蛋白質分解酵素（例えばプロテアーゼ）を固定化した膜などを組み合わせて、複合センサ

ーを構築する。このような、複数の酵素の組み合わせによる連続的反応を用いる複合センサーの構造は、当該技術分野においてよく知られており、例えば Biosensors -Fundamental and Applications-Anthony P. F. Tuner, Isao Karube and Geroge S. Wilson, Oxford University Press 1987 に記載されている。

- 5 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2003-116348号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

10 実施例

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

15 FAO の内部アミノ酸配列の決定

既報の文献"Screening and Characterization of Fructosyl-valine utilizing Marine Microorganisms" K.Sode et al., Mar. Biotechnol., 3, 126-132 (2001) に従い、当該株を培養した。Pichia sp. N1-1 株由来 FAO の精製酵素を得た。この精製酵素のサンプルを凍結乾燥後、 $145 \mu\text{g}$ の試料にたいしタンパク濃度

- 20 2mg/ml となるように超純水を加えた。この試料についてラピダス・スラブ電気泳動装置を用いて SDS-PAGE (10%ポリアクリルアミドゲル) を行った。 SDS-PAGE 後のゲルを $5 \times 5 \text{ cm}$ の大きさに切り出し、ファストシステム™を用いて PVDF 膜へのプロッティングを 2 h 行った。この PVDF 膜をクーマシープルード染色後、目的のバンドを切り出した。こうして得られた酵素をトリプシンで消化し、これを逆相液体クロマトグラフィーにより分離した。得られた解析パターンの一つのフラクションをアミノ酸シークエンサー (島津製作所製、PPSQ-10) により内部アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本酵素には GlyPhePhePheGluAlaAspGluAsnAsnGluIleLys から構成されるペプチド配列を含むことが明らかとなった。

実施例 2FAO をコードする遺伝子のクローニング

N1-1 株の cDNA の調製は以下のようにして行った。まず、N1-1 株から mRNA を抽出する。 N1-1 株を YM 培地で前培養(30°C、 5ml、 L 字管)後、 fructosyl valine:FV(終濃度 0.48%)を唯一の窒素源として加えた M9 最小培地 (M9/FV)に 1 % 植菌した(初期濃度 0.01、 30°C、 100ml、 500ml バッフル)。 OD₆₆₀=3 付近で集菌(5,000g、 15min、 4°C)後、 200 μl buffer A (1M ソルビトール、 100mM EDTA、 14mM メルカプトエタノール) を加え懸濁した。 20 μl ザイモリエイス溶液(1000U ザイモリエイス/1ml buffer A)を加え混和後、 30°C、 30min 静置した。遠心 (15,000rpm、 10min、 4°C) 後、沈殿を ISOGEN 1ml により懸濁し、室温、5min 静置した。0.2ml のクロロホルムを加え混和後、室温、3min 静置した。遠心 (15,000rpm、 15min、 4°C) 後、水相に 0.5ml イソプロパノールを加え混和し、室温、10min 静置した。遠心 (15,000rpm、 10min、 4°C) 後、沈殿に 1ml 70% エタノールを加え混和した。遠心 (15,000rpm、 5min、 4°C) 後、沈殿を 15min 真空乾燥した。ここで得られた mRNA をから該 cDNA を合成できる。

すなわち、 mRNA をもとに RT-PCR による cDNA を調製する常法において FAO 構造遺伝子を含む断片の增幅を行った。まず、 mRNA に対して、 RNA-PCR kit (AMV Ver.2.1 takara) のマニュアルに従い、オリゴ dT アダプタープライマーを用い逆転写反応を行った。得られた cDNA をエタノール沈殿法により精製後、これをテンプレートとして PCR を行った。PCR プライマーには、既報の FAODs の保存配列よりデザインした FAO-F1 と、 N1-1 株由来 FAOD のアミノ酸配列解析より得られたアミノ酸 13 残基よりデザインした FAO-R2 を用いることができる。

FAO-F1 5'-GGXACXTGGGGXWSXWSXACXGCXYTXCA-3'

FAO-R2 3'-TCYTCRTYXGGYTCVAWRAARAAXCC-5'

ただし S=C+G Y=C+T R=A+G X=A+C+G+T W=A+T V=A+C+G

これを以下の反応条件で PCR 増幅を行った。

94°C 1分

60°C 30秒

72°C 30秒

以上を1サイクル

5

98°C 30秒

60°C 30秒

72°C 7分

72°C 8分

以上を25サイクル

10 Taq ポリメラーゼは、TaKaRa LA *Taq*™を用いた。このようにして得られた PCR 産物を GENE CLEAN II Kit 付属のマニュアルに従いグラスミルク精製後、pGEM-T Vector System 付属のマニュアルに従いサブクローニングし、カラーセレクションにより、インサートを有するベクターを保持する形質転換体を得た。得られた形質転換体を LB 培地で培養(37°C、1.8ml、試験管)し、集菌、プラス

15 ミド抽出を行った。得られたプラスミドを M13 プライマーフォワード、M13 プライマーリバース(タカラバイオ(株))を用い、インサートの塩基配列解析を行った。サンプルの調整方法、解析法などは ABI プリズム 310 ジェネティックアナライザー (パーキンエルマー・アプライドバイオシステム社) 付属のマニュアルにしたがった。

20 次に、C末端付近の塩基配列を解析するために PCR を行った。前項で得られた精製後の cDNA をテンプレートとして PCR を行った。PCR プライマーには、インサートの塩基配列解析から得られた配列よりデザインした FAO-F3 と、アダプタープライマー配列を用いることができる。

FAO-F3 : 5'-ATTTCAAAGTGACGGATGAAGAAGCTAAAG-3'

25 adapter primer : 3'-CGCAGTTTCCCAGTCACGAC-5'

このようにして得られた cDNA より求められた FAO の内部部分配列情報をもとに、N1-1 株のゲノム DNA を鋳型としてインバース PCR によって、本酵素の構造遺伝子全長をクローニングできる。

N1-1 株からのゲノム DNA は以下のように抽出した。N1-1 株を YM 培地で

培養(30°C、100ml、300ml バッフル)後、25ml 培養液に対し、25ml エタノール、
1ml 0.5M EDTA を加え、-30°C、30min 静置した。集菌(5,000G、15min、
4°C)後、1ml 滅菌超純水を加え懸濁した。遠心(8,000rpm、5min、4°C)後、沈殿
に 0.5ml スフェロプラスト buffer(1.2M ソルビトール、0.1M EDTA、1% メル
5 カプトエタノール、0.1% ザイモリエイス)を加え懸濁し、37°C、30min 静置し
た。0.5ml Proteinase K buffer(50mM EDTA、0.3% SDS、0.01% proteinase
K)を加え混和後、65°C、30min 静置した。0.2ml の 5M 酢酸カリウムを加え混
和後、氷上にて 10min 静置した。遠心(10,000rpm、15min、4°C)後、上清を用
いてエタノール沈殿法を行い、沈殿を 15min 真空乾燥した。沈殿を 500 μl の
10 TE buffer(10mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)に溶解後、5 μl
の RNase を加え混和し、37°C、30min 静置した。その後フェノール・クロロホ
ルム抽出法、エタノール沈殿法を行った。沈殿を真空乾燥後、1ml 滅菌超純水
に溶解した。

15 このようにして得られた N1-1 株由来ゲノム DNA に対してインバース PCR
による FAOD 構造遺伝子断片の增幅を行った。得られたゲノム DNA を制限酵
素消化後、DNA Ligation Kit Ver.2 付属のマニュアルに従い、セルフライゲー
ションを行った。得られた環状 DNA をテンプレートとし、PCRを行った。プ
ライマーには FAO 構造遺伝子の部分配列よりデザインしたプライマー FAO-F5
及び FAO-R6 を用いた。

20 FAO-F5 5'-GTGCATACGAAGAACGATTGGGAGTGG-3'
FAO-R6 3'-CCATCCGTATCTCCGTCGAGAACATATCCTC-5'

これを以下の反応条件で PCR 増幅を行った。

94°C 1 分

60°C 30 秒

72°C 30 秒

以上を 1 サイクル

98°C 30 秒

60°C 30 秒

72°C 7 分

72°C 8分

以上を25サイクル

Taq ポリメラーゼは、 TaKaRa LA *Taq*TM を用いた。

5 このようにして得られた PCR 産物を再び精製し、その塩基配列を常法に従い解析した。これらの情報から得られた FAO 遺伝子配列情報をもとに、この全長断片を含む遺伝子を N1-1 ゲノム DNA から PCR 増幅により調製できる。すなわち、同遺伝子領域を含む配列を増幅するために

FAO-NcoI : 5'-ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-XbaI : 3'-TTGATTCTAGACATGTATGTTGTAATCTTG-5'

10 をデザインした。これらを上記の PCR サイクルによって反応することにより、目的断片を含むゲノム DNA を増幅した。

反応条件は以下のサイクルで行った。

94°C 5分

94°C 30秒

55°C 30秒

72°C 1分

72°C 5分

] 25サイクル

15

上記の方法により得られた FAO 遺伝子の塩基配列は、常法により全自动塩基配列解析装置により解読した。また、 FAO のアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

実施例 3

組換え生産用ベクターの構築

上記のようにして、一度選択された FAO 遺伝子を保有する組換えベクターより、微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、 FAO 遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素や PCR 法により FAO 遺伝子である DNA を回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレーション法などを用いることができる。

また、大腸菌をもちいて N1-1 株由来 FAO の組み換え生産がおこなえる。得られた N1-1 株由来 FAO の構造遺伝子配列情報から N 末端、C 末端に相補的なプライマーをデザインした。この際、N 末端側のプライマーには *Nco* I (FAO-*Nco* I)、C 末端側のプライマーには *Xba* I (FAO-*Xba* I) を付加した。

- 5 FAO-*Nco*I : 5'-ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'
FAO-*Xba*I : 3'-TTGATTCTAGACATGTATGTTGTAATCTTG-5'
上記記載の方法により得られた cDNA、あるいはゲノム DNA をテンプレートとし、上記のプライマーを用いて PCR により FAOD 構造遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Nco* I、*Xba* I 消化し、同制限酵素消化した高発現ベクター
10 pTrc99a(Invitrogen 社)とライゲーション(DNA Ligation Kit Ver. 2)プラスミド (pTN1) を作成できる。このようにして作成された p TN1 を大腸菌に形質転換することにより、組み換え FAOD の生産量が行える。

実施例 4

組み換え大腸菌による FAO の生産

FAO の構造遺伝子を含むプラスミド pTN1 が形質転換されている大腸菌、*Escherichia coli* DH5 α /pTN1 を用いて FAO の生産を行った。当該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 培地 3 ml に植菌し、37°Cで 12 時間培養を行い、遠心分離機により細胞を集菌した。この細胞をフレンチプレス (1500kgf) で破碎した後、超遠心 (4°C、160,400×g、90 分) により上清の水溶性画分 (10mM リン酸カリウム緩衝液 pH6.0) を分離した。このようにして調製された形質転換大腸菌は細胞内に FAO を発現した。野性型 *Pichia* sp. N1-1 をもちいて該酵素を生産する場合には、市販されておらず、かつ入手が困難で高価であるフルクトシルアミン化合物を培地に添加しなければ該酵素は誘導されず生産ができないが、本組換え法では従来、大腸菌組換え技術で用いられている IPTG を用いて誘導すれば酵素生産を誘導でき、経済的である。また、その生産量は野性型 *Pichia* sp. N1-1 株を用いてフルクトシルバリンを用いて誘導生産したときに比べ、単位蛋白質あたり 1.5 倍以上であった (図 6)。

実施例 5酵素の精製

組み換え FAO の精製は以下のようにして行った。まず、組み換え大腸菌から該酵素を含む水溶性画分を調製した。pTN1/DH5 α を LB 培地により培養(37℃、5 7l、10l ファーメンター、アンピシリン 50 μ g/ml)し、OD₆₆₀=0.7 付近で IPTG(終濃度 0.3mM)によりインダクションをかけ、培養温度を 30℃に下げた。得られた菌体を 100mM PPb (pH7.0) に懸濁し、フレンチプレスにより 4 回破碎を行った。破碎液上清を超遠心(40,000g、90min)し、上清を 10mM PPb (pH7.0)により一晩、4℃にて透析し、水溶性画分を調製した。さらにえられた 10 水溶性画分を以下のように液体クロマトグラフィーに供することにより精製酵素を調製できる。まず、陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-5PW) を行う。 10mM PPb (pH7.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム DEAE-5PW (5.0mm I.D.×5cm、トーソー (株)) に、得られた水溶性画分を吸着させた。カラム容量 3 倍量の 10mM PPb (pH7.0) で平衡化した後、0.7M 15 の NaCl を含む 10mM PPb (pH7.0) で FAOD を溶出させた。流速は 1ml/min とし、一分ごとに溶出液の回収を行った。溶出物の検出には 280nm の吸光波長を用いた。得られた活性画分を 35% 硫安分画後、上清を次の疎水クロマトグラフィーに供する。35% 硫酸アンモニウムを含む 10mM PPb (pH6.5) で平衡化した疎水カラムクロマトグラフィー用充填カラム Resource Phe(1ml、ファルマシア(株))に、上記記載の活性画分を吸着させた。カラム容量 3 倍量の 35% 硫酸 20 アンモニウムを含む 10mM PPb (pH6.5) で平衡化した後、10mM PPb (pH6.5) を用いて FAOD を溶出させた。流速は 2ml/min とし、1 分ごとに溶出物の回収を行った。得られた活性画分を 45% 硫安分画後、沈殿を 1% マンノース、100 μ M FAD を含む 10mM PPb (pH7.0) に溶解後、同緩衝液により 6 時間、4℃にて透析を行った。さらに 100 μ M FAD を含む 10mM PPb (pH8.0) 25 により 6 時間、4℃にて透析を行った。透析後のサンプルを次の陰イオン交換クロマトグラフィーに供する。10mM PPb (pH8.0) で平衡化した陰イオンクロマトグラフィー用充填カラム Bioasit Q (4.6mm I.D.×5cm、トーソー (株)) に、上記で得られたサンプルを吸着させた。カラム容量 3 倍量の 10mM PPb

(pH8.0)で平衡化した後、0.3MのNaClを含む10mM PPb(pH7.0)でFAODを溶出させた。流速は1ml/minとし、一分ごとに溶出液の回収を行った。得られた活性画分を10mM PPb(pH7.0)により、一晩、4°Cにて透析した。このようにして得られた試料の精製度はSDS/PAGEにより検定できる。ファストゲル5 8-25を用いて電気泳動を行い、サンプル泳動後のゲルを銀染色した。サンプルの調製方法、泳動法、染色方法はPhast System™付属のマニュアルにしたがった。精製された酵素の電気泳動写真を図7に示す。

実施例6

10 酵素活性の検討

実施例5で得られた精製酵素用いて、fructosyl valine、N^ε-fructosyl lysine、fructosyl glycine、fructosyl alanine、fructosyl leusine、fructosyl phenylalanine、グルコース、サルコシンに対する反応性の検討を行った。測定には基質(10mM)、PPb(pH 7.0、50mM)、Phenol(1.5mM)、4アミノアンチピリン(1.5mM)、ペルオキシダーゼ(2U/ml)を用いてPOD/Phenol/4A.A.法により505nmの吸光度の変化を測定することにより行った。得られた酵素の活性ならびに基質特異性について大腸菌を用いて生産された組換えFAOならびに酵母Pichia sp. N1-1野性株で生産された酵素と比較した結果を図8に示す。このように、組換えDNAにより、より高い活性を有するFAOを生産することができた。
20

実施例7

フルクトシルアミン類のアッセイ

本発明のフルクトシルアミン酸化酵素を用いてフルクトシルバリンをアッセイした。ペルオキシダーゼ～4-アミノアンチピリン系を用いた測定系を用いて、本発明のフルクトシルアミン酸化酵素(FAO)に対し、フルクトシルバリン酸化活性のフルクトシルバリン濃度依存性について測定した。1. 5mM 4-アミノアンチピリン、2. 0mMフェノール、2U/mIペルオキシダーゼを含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の存在下で、室温で1分間反応させた時の

505nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素反応速度とした。0.1mM から 5mM の間で直線性が見られ、この濃度範囲でのフルクトシルバリン定量が可能であった。

5 実施例 8

フルクトシルバリン酸素電極型酵素センサー

実施例 5 に従い調製した F A O 1 0 0 マイクロリットル (5. 7mg 蛋白質 / m l) をキムワイプに含浸し、これを D K K 社製酸素電極に装着し透析膜によって覆った。作成した酵素電極を 3 0 ℃ に保温した 1 0 ml P B S (p H 7. 4) 内に挿入した。ここに 1 M のフルクトシルバリン水溶液 5 0 マイクロリットルを随時添加し、その時の電流減少値を観測した。この結果、本発明の新規フルクトシルアミン 酸化酵素を用いた酵素センサーにより、 5 mM - 2 0 mM の範囲でフルクトシルバリンの定量を行うことができた。

15 実施例 9

メディエータ型酵素センサー

実施例 5 に従い調製した F A O 0.34unit 分を、凍結乾燥し、カーボンペースト 20mg と混合し、カーボンペースト電極に充填し、濾紙上で表面を平らにした。1% グルタルアルデヒド 30 分間、表面を架橋した後、 10mM リジンで 20 分処理することで未反応のアルデヒド基をプロッキングした。これを酵素電極とし、 20mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0) 中で 1 時間以上室温で攪拌し、平衡化した。メディエーターとして終濃度 1mM のメトキシ PMS を含む、 20mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0) を反応溶液とし、総量を 10ml とした。そこに作用電極として作製したカーボンペースト電極を用い、対極として白金電極、参照極として Ag/AgCl 電極を用い +0.15V の電位を印加した。測定は 25 ℃ で行った。電流値が定常になったところ(約 1 時間)で、基質 (フルクトシルバリン) 溶液を 100 μl ずつ注入した。基質の注入に伴って得られるピーク電流の、定常電流値からの高さを応答電流値として用いた。フルクトシルバリンを加えていないときの電流値を 0A とし応答電流値を計測した。このときのフルクトシルバリン濃度に対する応

答電流値は濃度に依存していた。注入したフルクトシルバリン濃度に対し、0.1mM から 0.6mM の範囲で応答電流値との間に直線性を示し、この範囲において計測可能であることが示された。サンプルを注入後、定常電流値を示すまでには 4 分ほどであった。

5

実施例 10

過酸化水素検出型センサー

まず酵素固定化膜を調製した。実施例 5 に従い調製した FAO $50\mu\text{l}$ (0.05unit 分) と光架橋性樹脂プレポリマーである PVA-SbQ 水溶液 0.23g を混合し、プレート上に 21cm²の面積に薄く伸ばした。暗所で 5 時間風乾した後、両面を蛍光灯の光に 5 分ずつさらした。この膜を光固定化酵素膜とし 4°C で保存した。作製した膜を、BAS 社製白金電極 (モデル No.11-1012) 表面に被覆してからナイロンネットをかぶせ O リングで固定して酵素電極とし、作用極とした。参考電極に Ag/AgCl、対極には白金電極を用いた。恒温セル (25°C) に 500mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を 10ml 加え、光架橋性樹脂固定化酵素電極を浸漬した。ポテンシオスタットを用いて電位+0.6V vs. Ag/AgCl を印加し、電流値が定常になったところ(約 1 時間)で、基質 (フルクトシルバリン) 溶液を 100 μl ずつ注入した。基質の注入に伴って得られるピーク電流の、定常電流値からの高さを応答電流値として用いた。構築したバッチ型のシステムを用いて、フルクトシルバリン濃度に依存した応答曲線が得られた。注入したフルクトシルバリン濃度に対し、0.05mM から 2mM の範囲で直線性を示し、この範囲において計測可能であることが示された。

実施例 11

ブルシアンブルー型センサー

グラッシャーカーボン電極 (BAS 社、モデル No. 11-2012) 上で 0.1M 塩化カリウム緩衝液中に終濃度 2mM ヘキサシアノ鉄 (III) カリウムと、2mM の塩化 (III) 鉄を加え、25°C、60 秒間、+0.4V vs Ag/AgCl の電位を印加し、フィルムを付着させた。その後、-0.05V から 0.35V の電位を印加 (10 回) していくことで

フィルムを形成させていき、プルシアンブルーフィルム固定化電極を作製した。実施例 5 に示した方法 (0.136unit)で作製した FAO 固定化膜でプルシアンブルーフィルム固定化電極を被覆した。参照電極に Ag/AgCl、対極には白金電極を用いた。恒温セル (25°C) に 500mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を 10ml 加え、を用いた。ポテンシオスタットを用いてプルシアンブルーフィルム固定化酵素電極に 0.05Vvs. Ag/AgCl を印加し、電流値が定常になったところ(約 1 時間)で、基質 (フルクトシルバリン) 溶液を 100 μl ずつ注入した。基質の注入に伴って得られるピーク電流の、定常電流値からの高さを応答電流値として用いた。構築したバッチ型のシステムを用いて、フルクトシルバリン濃度に依存した再現性の良い結果が得られた。注入したフルクトシルバリン濃度に対し、0.1mM から 1.6mM の範囲で応答電流値との間に直線性を示し、この範囲において計測可能であることが示された。サンプルを注入後、定常電流値を示すまでには 6 分ほどであった。

15 産業上の利用性

本発明により *Pichia* sp. 由来の糖化ヘモグロビン(HbA1c)測定用の酵素、フルクトシルアミン酸化酵素の構造遺伝子をクローニングし、大腸菌において組換え生産することに成功した。このことにより、大量に FAO を生産できるようになった。本酵素は臨床検体の分析に応用できる。

請求の範囲

1. 以下の(a)または(b)のいずれかである、フルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質：
 - 5 (a) 配列表・配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質；
(b) アミノ酸配列(a)において、1 もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質。
 - 10 2. 配列 GlyPhePhePheGluAlaAspGluAsnAsnGLuIleLys を含むフルクトシルアミン酸化酵素。
 - 15 3. 以下の e)~h) の「いずれかの配列を有することを特徴とするフルクトシルアミン酸化酵素。
 - e) PheHisTyrAspTyrValAlaProLeuAlaLysProAsnSerLysGluArg
 - f) AspAlaProLeuLeuHisAspLysGluTyrTyrGluGLuLeuGlnLys-
 - 20 AsnGlyLeuArgAsnTyrArgTyrIleSerThr
 - g) ThrLysGlyAspLysGlyLeuAspProGluAspLys
 - h) TrpValSerValGluAsnProThrProHisLysLeuGlu
 - 25 4. Pichia sp. N1-1 株または Pichia 属由来である、請求項 1-3 記載のフルクトシルアミン酸化酵素。
 5. 以下の(a)または(b)：
 - (a) 配列表・配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質；
(b) アミノ酸配列(a)において、1 もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質、
 - 25 の蛋白質であるフルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子。
 6. 以下の(c)または(d)：
 - (c) 配列表・配列番号 2 に記載された塩基配列からなる DNA；
(d) 上記(c)の配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加されており、かつフルクトシルアミン酸化酵素活性を有する蛋白質をコードする

DNA、

のいずれかである、フルクトシルアミン酸化酵素をコードする遺伝子。

7. 請求項 5 または 6 に記載の遺伝子を含有する組み換えベクター。

8. 請求項 7 に記載の組み換えベクターで形質転換した形質転換体または形質導入体。
5

9. 請求項 8 記載の形質転換体を培養して、該培養物からフルクトシルアミン酸化酵素を採取することを含む、フルクトシルアミン酸化酵素の製造方法。

10. 請求項 9 記載の方法で製造されたフルクトシルアミン酸化酵素。

11. 請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、フルクトシルアミン化合物類の分光学的分析方法。
10

12. 請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、フルクトシルアミン化合物類の電気化学的分析法。

13. 請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、フルクトシルバリンの電気化学的分析法。

14. HbA1c をアッセイする方法であって、試料中の HbA1c を分解してフルクトシルバリンを生成し、前記フルクトシルバリンを請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて分光学的に分析することを含む方法。
15

15. フルクトサミンをアッセイする方法であって、試料中のフルクトサミンを分解してフルクトシルアミン化合物を生成し、前記フルクトシルバリンを請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて分光学的に分析することを含む方法。
20

16. グリコアルブミンをアッセイする方法であって、試料中のグリコアルブミンを分解してフルクトシルアミン化合物を生成し、前記フルクトシルバリンを請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いて分光学的に分析することを含む方法。
25

17. 請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、HbA1c の電気化学的分析法。

18. 請求項 1 – 4 または 10 に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いるこ

とを特徴とする、フルクトサミンの電気化学的分析法。

19. 請求項1-4または10に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を用いることを特徴とする、グリコアルブミンの電気化学的分析法。

20. 請求項1-4または10に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含む、フルクトシルバリンアッセイキット。

21. 請求項1-4または10に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含む、HbA1cアッセイキット。

22. 請求項1-4または10に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含む、フルクトサミンアッセイキット。

10 23. 請求項1-4または10に記載のフルクトシルアミン酸化酵素を含む、グリコアルブミンアッセイキット。

24. 請求項1-4または10に記載のフルクトシルアミン酸化酵素が固定化されている酵素電極。

25. 請求項18記載の酵素電極を作用電極として含む酵素センサー。

1/7

1 Met Glu Ser Ile Ile Val Gly Ala Gly Thr Phe Glu Leu Ser Thr Ala Leu Glu Leu Ala Arg Asp Glu Tyr Lys Asn Ile Lys Cys
 1 ATGGAGTCGA TAAATTAGT TGGTGCCGGT ACTTTGGCC CTTACAGCTT GCCAGAGATG GATACAAGAA CATAAAATGT
 +1 Phe Asp Lys Phe Pro Val Pro Ser Glu Ile Ala Ala Gly Asn Asp Ser Asn Lys Ile Phe His Tyr Asp Tyr Val Ala Pro Leu Ala Lys
 91 TTGACAGT TCCGGTCCC ATCTGAGATA GCTGCTGGAA ACCGACAGTA CAAGATTIT CACTACGATT ATGTTGCTCC CCTGGCTAAA
 +1 Pro Asn Ser Lys Glu Arg Leu Ser Leu Glu Ala Leu His Asp Lys Leu Top Lys Thr Asp Pro Val Tyr Lys Pro Tyr His Pro Val Gly Phe
 181 CCCAATTCAA AGAACCGGT GAGTCTCGAA GCATTACACC TTGGAGAGAC AGATTCCGGTG TACAAACCGT ACTATCATCC GGTAGGATT
 +1 Ile Leu Ala Ala Ser Ser Asp Ala Pro Leu His Asp Lys Glu Tyr Tyr Glu Leu Gln Lys Asn Gly Leu Arg Asn Tyr Arg Tyr
 271 ATCCTGGCTG CAAAGTCCGA TGCTCCATT CTGCATGATA AGGAATACTA TGAAAGGTTG CAAAAACG GACTTCGAA TTATCGTTAT
 +1 Ile Ser Thr Pro Glu Glu Phe Arg Glu Tyr Leu Pro Ile Leu Lys Glu Pro Leu Pro Asn Tip Arg Gly Tyr Val Leu Asp Gly Asp Asn
 361 ATTCAACTC CGGAGGATT TCGTAGTAT TTGCCATT TAAGGGCCC GTTACCCAC TGCAAGGATT AGTTCTCGA CGTAGATAC
 +1 Gly Tip Leu His Ala Arg Asp Ser Leu Lys Ser Ala Tyr Glu Glu Cys Lys Arg Leu Gly Val Glu Phe Val Phe Gly Asp Gly Asn
 451 GGATGGTTGC ATGCTCGAGA CTCATTGAA AGTCGCTACG AACGTTGCA ACCATTGGAA GTGGAAATTG TGTTGGAGA CGATGGGAA
 +1 Ile Val Glu Leu Asn Glu Asn Glu Lys Leu Thr Glu Ile Arg Ala Arg Ser Gly Ala Ile Phe Ser Ala Glu Lys Tyr Val Leu Ser
 541 ATTGTCAAT TACCTAACGA AAATGGAAAG TTGACGGAA TTAGGGCCAG ATCTGGTGC ATATTCTCGG CACAAATA TGTTCTCAGC
 +1 Ser Gly Ala Asn Ala Val Thr Leu Leu Asn Phe Glu Arg Glu Leu Glu Ily Lys Cys Phe Thr Leu Ala His Phe Lys Val Thr Asp Glu
 631 TCTGGTCAA ATGCACTAAC GTTGTTAAAT TTCCAGAGAC AGCTAGAAGG TAATGTTTC ACTTTGGCAC ATTCAAGT GACCGATGAA
 +1 Glu Ala Lys Ala Phe Lys Ser Leu Pro Val Leu Phe Asn Ala Glu Lys Gly Phe Phe Glu Ala Asp Glu Asn Asn Glu Ile Lys Ile
 721 GAACTTAAG CATTAAAG CTTGCCGGTC CTTTCAATG CCGAAAGG GTTTTTTC GAGGCTGATG AAGATACGA ARTCAAAATT
 +1 Cys Asn Glu Tyr Pro Glu Phe Thr His Thr Asn Glu Ser Gly Glu Ser Ile Pro Ile Tyr Arg Met Glu Ile Pro Leu Glu Ser Ala Leu
 811 TGCACCGATT ACCCTGGATT TACCCACACA ATGAAATCCG GAGAGCTAT CCCACCTCTAC CGGATGGAGA TTCCACTCGA GTCAGCACTT
 +1 Glu Ile Arg Glu Tyr Leu Lys Glu Thr Met Pro Glu Ala Asp Arg Pro Phe Thr Lys Thr Arg Ile Cys Tip Cys Thr Asp Ser Pro
 901 GAAATTAGAC ATTACTTGAA AGAACCATG CCTCAAGTTG CTGATAGACC TTTCAACAG ACAGAAATT GTGGGTTGAC CGACTCTCCC
 +1 Asp Met Glu Leu Ile Leu Cys Thr His Pro Glu Tyr Thr Asn Leu Ile Val Ala Ser Gly Asp Ser Gly Asn Ser Phe Lys Ile Met Pro
 991 GACATGCAAT TGATCTTG TGACTCACCA GAATCACCA ACCTTATTTG AGCATCGGGT GACTCTGGAA ATTCTGTCAA GATCATGCCA
 +1 Ile Ile Glu Lys Tyr Val Ser Lys Val Val Thr Lys Glu Asp Lys Glu Leu Asp Pro Glu Asp Lys Glu Cys Tip Lys Tip Arg Pro Glu
 1081 ATCATTGGCA AATTGTCAAGT CAAGTTGTT ACCAAAGGTG ATAAAGGATT GGATCCGGAA GATAARGAAT GCTGGAAATG GCGTCCTGAG
 +1 Thr Tip Asp Lys Arg Gly Glu Val Arg Tip Gly Gly Arg Tyr Arg Val Ala Asp Leu Asn Glu Ile Glu Tip Val Ser Val Glu Asn
 1171 ACTTGGGACA AGCGGGGCA GGTCCGGCTGG GGTGGTCAAC ACCGTGTTGAT GGATTGAAAG GAAATTGAAAG AATGGGTTTC TGTGAAAT
 +1 Pro Thr Pro His Lys Leu Glu ...
 1261 CCCACACCAC ACAAACTAGA ATAA

☒ 1

mesiiivgagtfglstaqlardgyknikfdkfpvpseiaagndsnkifhydyvaplakpnskerlslealhlwktdpvykpyyhp
vgfilaassdapllhdkeyyeelqknglrnyryistpeefreylpilkgp1pnwrgyvldgdngwlhardslksayeckrlgvefv
fgddgeivellnengkltgirarsgaifaqkyvlssganavtlinfqarqlegkcfllahfkvtdeeakafkslpvlfnaekgfffe
adenneikicneypgfhinesgesiplyrmeiplesaleirqylketmpqfadrpftktricwctdspdmlilclthpeytnliava
sgdsgnsfkimpiigkyvskvvtkgdkglpedkecwkwrepetwdkrqvrwggrgyrvadlneieewvsvenptphkle

2

3

FAO-F1 5'-GGXACXTGGGXWSXWSXACXGCXYTXCA-3'
FAO-R2 3'-TCYTCRTYXGGYTCVAWRAARAAXCC-5'
ただし* S=C+G Y=C+T R=A+G X=A+C+G+T W=A+T V=A+C+G

FAO-F3 : 5'-ATTCAAAGTGACGGATGAAGAAGCTAAAG-3'
アダプタープライマー : 3'-CGCAGTTTCCCAGTCACGAC-5'

FAO-F5 5'-GTGCATACGAAGAACATGCAAACGATTGGGAGTGG-3'

FAO-R6 3'-CCATCCGTTATCTCCGTCGAGAACATATCCTC-5'

FAO-NcoI : 5'-ATCACCATGGAGTCGATAATTATAGTTGG-3'

FAO-XbaI : 3'-TTGATTCTAGACATGTATGTTGTAATCTTG-5'

図 4

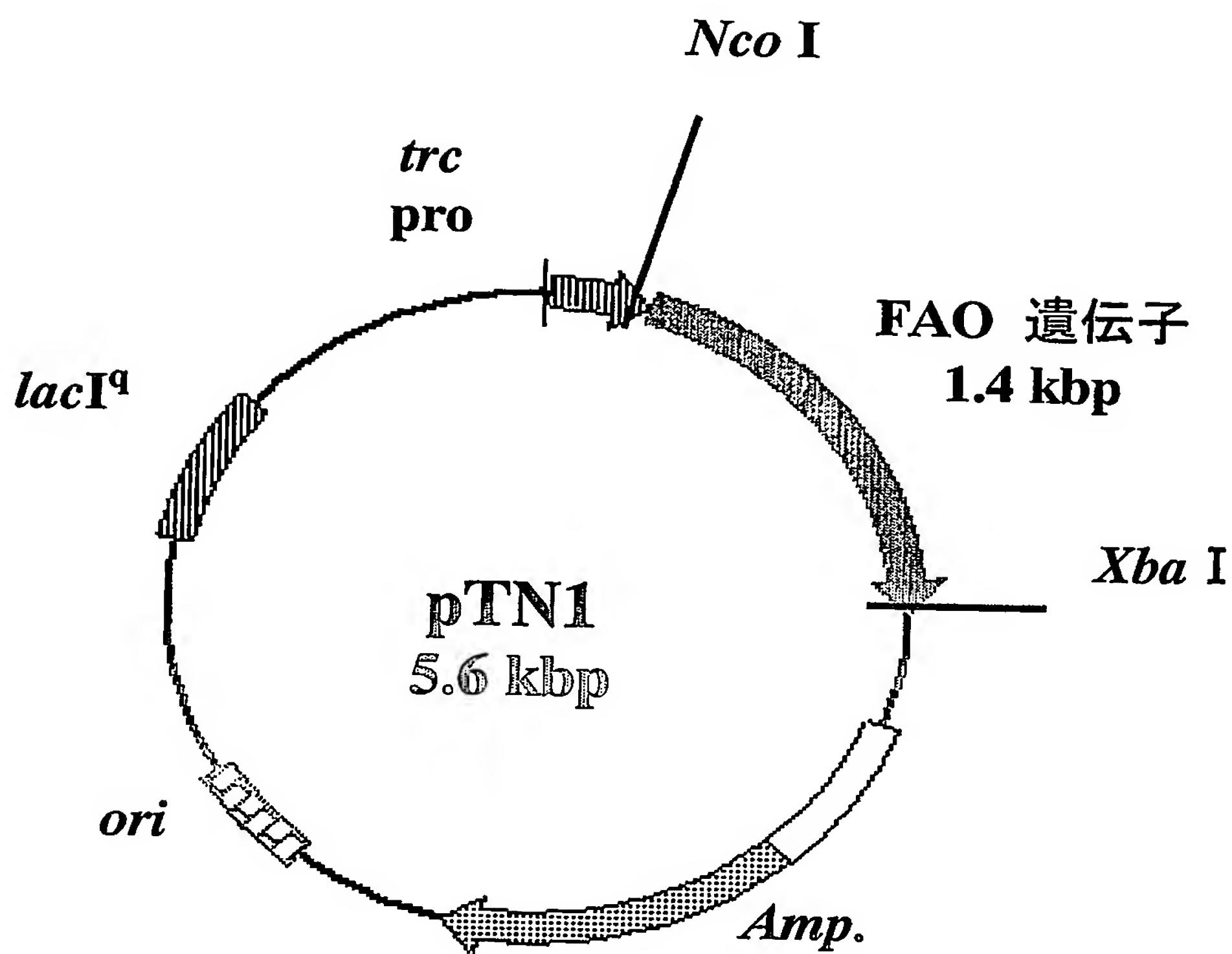


図 5

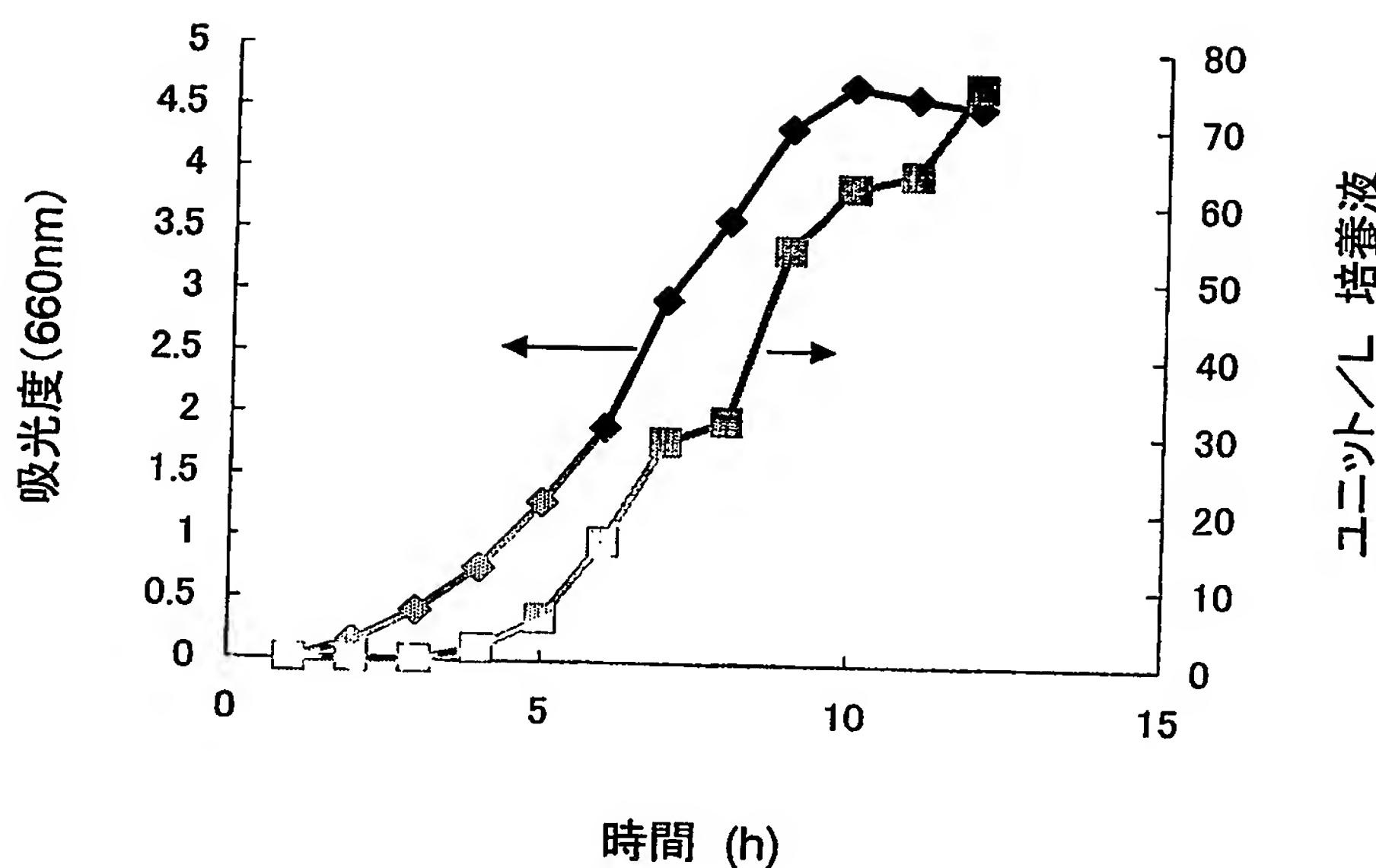
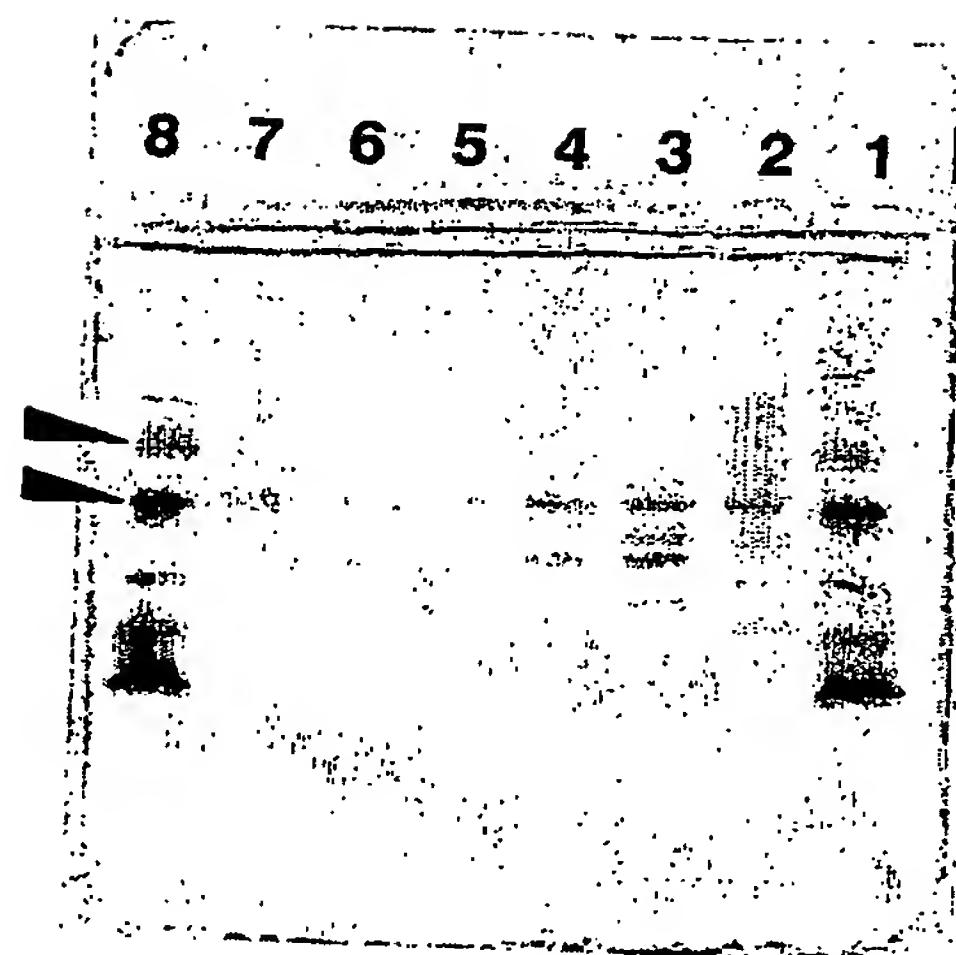


図 6

67kDa
43kDak



- 1:LMW
- 2:可溶性画分
- 3:DEAE 5PW の後
- 4:RESOURCE Phe の後
- 5:Q No.23 の後
- 6:Bioassist Q No.24 の後
- 7:Bioassist Q No.25 の後
- 8:LMW

図 7

動力学的パラメータ

| | 組換え |
|------------------|------------|
| K_m (mM) | 5.9 |
| V_{max} (U/mg) | 7.1 |

基質特異性

| 基質 | 活性(%) | |
|----------------|------------|------------|
| | 組換え | 野生型 |
| フルクトシルバリン | 100 | 100 |
| フルクトシルリシン | 120 | 135 |
| フルクトシルグリシン | 4 | 9 |
| フルクトシルアラニン | 56 | 60 |
| フルクトシルロイシン | 14 | 31 |
| フルクトシルフェニルアラニン | 104 | 103 |

図 8

SEQUENCE LISTING

<110> Sode, Koji

<120> Fructosylamine Oxidase

<130> PSD-9012W0

<150> JP 2003-116348

<151> 2003-03-17

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 427

<212> PRT

<213> Pichia sp.

<400> 1

Met Glu Ser Ile Ile Ile Val Gly Ala Gly Thr Phe Gly Leu Ser Thr

1 5 10 15

Ala Leu Gln Leu Ala Arg Asp Gly Tyr Lys Asn Ile Lys Cys Phe Asp

20 25 30

Lys Phe Pro Val Pro Ser Glu Ile Ala Ala Gly Asn Asp Ser Asn Lys

35 40 45

Ile Phe His Tyr Asp Tyr Val Ala Pro Leu Ala Lys Pro Asn Ser Lys

50 55 60

Glu Arg Leu Ser Leu Glu Ala Leu His Leu Trp Lys Thr Asp Pro Val

65 70 75 80

Tyr Lys Pro Tyr Tyr His Pro Val Gly Phe Ile Leu Ala Ala Ser Ser

85 90 95

Asp Ala Pro Leu Leu His Asp Lys Glu Tyr Tyr Glu Glu Leu Gln Lys

100 105 110

Asn Gly Leu Arg Asn Tyr Arg Tyr Ile Ser Thr Pro Glu Glu Phe Arg

115 120 125

Glu Tyr Leu Pro Ile Leu Lys Gly Pro Leu Pro Asn Trp Arg Gly Tyr

130 135 140
Val Leu Asp Gly Asp Asn Gly Trp Leu His Ala Arg Asp Ser Leu Lys
145 150 155 160
Ser Ala Tyr Glu Glu Cys Lys Arg Leu Gly Val Glu Phe Val Phe Gly
165 170 175
Asp Asp Gly Glu Ile Val Glu Leu Leu Asn Glu Asn Gly Lys Leu Thr
180 185 190
Gly Ile Arg Ala Arg Ser Gly Ala Ile Phe Ser Ala Gln Lys Tyr Val
195 200 205
Leu Ser Ser Gly Ala Asn Ala Val Thr Leu Leu Asn Phe Gln Arg Gln
210 215 220
Leu Glu Gly Lys Cys Phe Thr Leu Ala His Phe Lys Val Thr Asp Glu
225 230 235 240
Glu Ala Lys Ala Phe Lys Ser Leu Pro Val Leu Phe Asn Ala Glu Lys
245 250 255
Gly Phe Phe Phe Glu Ala Asp Glu Asn Asn Glu Ile Lys Ile Cys Asn
260 265 270
Glu Tyr Pro Gly Phe Thr His Thr Asn Glu Ser Gly Glu Ser Ile Pro
275 280 285
Leu Tyr Arg Met Glu Ile Pro Leu Glu Ser Ala Leu Glu Ile Arg Gln
290 295 300
Tyr Leu Lys Glu Thr Met Pro Gln Phe Ala Asp Arg Pro Phe Thr Lys
305 310 315 320
Thr Arg Ile Cys Trp Cys Thr Asp Ser Pro Asp Met Gln Leu Ile Leu
325 330 335
Cys Thr His Pro Glu Tyr Thr Asn Leu Ile Val Ala Ser Gly Asp Ser
340 345 350
Gly Asn Ser Phe Lys Ile Met Pro Ile Ile Gly Lys Tyr Val Ser Lys
355 360 365
Val Val Thr Lys Gly Asp Lys Gly Leu Asp Pro Glu Asp Lys Glu Cys

| | | |
|---|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 |
| Trp Lys Trp Arg Pro Glu Thr Trp Asp Lys Arg Gly Gln Val Arg Trp | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Gly Gly Arg Tyr Arg Val Ala Asp Leu Asn Glu Ile Glu Glu Trp Val | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Ser Val Glu Asn Pro Thr Pro His Lys Leu Glu | | |
| 420 | 425 | |
| <210> 2 | | |
| <211> 1284 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Pichia sp. | | |
| <400> 2 | | |
| atggagtcga taattatagt tggtgccggt acttttgggc tttccacagc cttacagctt 60 | | |
| gccagagatg gataacaagaa cataaaaatgt ttgacaagt ttccggttcc atctgagata 120 | | |
| gctgctggaa acgacagtaa caagatttt cactacgatt atgttgctcc cctggctaaa 180 | | |
| cccaattcaa aagaacggtt gagtctcgaa gcattacacc tttggaagac agatccggtg 240 | | |
| tacaaaccgt actatcatcc ggtaggattt atccctggctg caagttccga tgctccatta 300 | | |
| ctgcatgata aggaatacta tgaagagttt caaaaaaaaacg gacttcgcaa ttatcgttat 360 | | |
| atttcaactc ccgaggagtt tcgtgagttt ttgcccattt taaagggccc gttacccaac 420 | | |
| tggagaggat atgttctcgaa cggagataac ggatggttgc atgctcgaga ctcattgaaa 480 | | |
| agtgcatacg aagaatgcaa acgattggga gtggattttg ttttggaga cgatggggaa 540 | | |
| attgtcgaat tacttaacga aaatggaaag ttgacggaa ttagggccag atctggtgcc 600 | | |
| atattctcggt cacaaaaaata tggtcgtcagc tctggtgcaa atgcagtaac gttgttaat 660 | | |
| ttccagagac agctagaagg taaatgtttc actttggcac atttcaaagt gacggatgaa 720 | | |
| gaagctaaag cattaaaag ctggccggtc ctttcaatg ccgaaaaagg gtttttttc 780 | | |
| gaggctgatg aaaataacga aatcaaaatt tgcaacgagt accctggatt tacccacaca 840 | | |
| aatgaatccg gagagtctat cccactctac cggatggaga ttccactcgaa gtcagcactt 900 | | |
| gaaatttagac aatacttcaa agaaaccatg cctcagtttgcgtatagacc tttcaccaag 960 | | |
| acaagaattt gttgggtgtac cgactctccc gacatgcaat tgatcttgatg tactcacca 1020 | | |
| gaatacacca accttattgt agcatcggtt gactctggaa attcgtaaa gatcatgcca 1080 | | |

atcattggca aatatgtcag caaggttgtt accaaagggtg ataaaggatt ggatccggaa 1140
gataaagaat gctggaaatg gcgtcctgag acttgggaca agcggggca ggtccgctgg 1200
ggtgttcgtat accgtgttgc ggattgaac gaaattgaag aatgggttc tttgaaaat 1260
cccacaccac acaaactaga ataa 1284

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> *Pichia* sp.

<400> 3

Gly Phe Phe Phe Glu Ala Asp Glu Asn Asn Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> *Pichia* sp.

<400> 4

Phe His Tyr Asp Tyr Val Ala Pro Leu Ala Lys Pro Asn Ser Lys Glu

1 5 10 15

Arg

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> *Pichia* sp.

<400> 5

Asp Ala Pro Leu Leu His Asp Lys Glu Tyr Tyr Glu Glu Leu Gln Lys

1 5 10 15

Asn Gly Leu Arg Asn Tyr Arg Tyr Ile Ser Thr

20

25

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> *Pichia* sp.

<400> 6

Thr Lys Gly Asp Lys Gly Leu Asp Pro Glu Asp Lys

1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> *Pichia* sp.

<400> 7

Trp Val Ser Val Glu Asn Pro Thr Pro His Lys Leu Glu

1 5 10

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> variation

<222> 3

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 6

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 12

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 15

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 18

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 21

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 24

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 27

<223> n is a, g, c or t

<400> 8

ggnacntggg gnwsnwsnac ngcnytnca

29

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<220>

<221> variation

<222> 9

<223> n is a, g, c or t

<220>

<221> variation

<222> 24

<223> n is a, g, c or t

<400> 9

tcytcryng gytcvawraa raancc

26

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

attcaaagt gacggatgaa gaagctaaag

30

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcagtttc ccagtcacga c

21

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

gtgcatacga agaatgcaaa cgattggag tgg

33

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ccatccgtta tctccgtcga gaacatatcc tc

32

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

atcaccatgg agtcgataat tatagttgg

29

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

ttgattctag acatgtatgt tgtaatcttg

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/06, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/26, C12M1/40, G01N27/46, G01N27/30, G01N27/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/06, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/26, C12M1/40, G01N27/46, G01N27/30, G01N27/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | Sode K. et al., Screening and characterization of fructosyl-valine-utilizing marine microorganisms, Mar. Biotechnol., 2001, Vol.3, No.2, pages 126-32 | 1-25 |
| X | JP 2000-270855 A (Koji SODE), 03 October, 2000 (03.10.00), Full text (Family: none) | 1-25 |
| X | JP 2001-204494 A (Koji SODE), 31 July, 2001 (31.07.01), Full text (Family: none) | 11-25 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
 28 May, 2004 (28.05.04)

Date of mailing of the international search report
 15 June, 2004 (15.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003587

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003587

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The matter common to claims 1 to 10, 24 to 25 and 11 to 23 resides in a fructosylamine oxidase.

As the results of the search, however, it is found out that this fructosylamine oxidase is not novel because of having been reported by Sode K. et al., Screening and characterization of fructosyl-valine-utilizing marine microorganisms, Mar. Biotechnol., 2001, Vol.3, pages 126-32.

Hence, the fructosylamine oxidase falls within the category of prior art and thus the above common matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2.

Accordingly, there is no matter common to all claims.

Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found out among these inventions differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is clear that claims 1 to 10, 24 to 25 and 11 to 23 do not comply with the requirement of unity of invention.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/003587

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

I n t. C I. 7 C12N9/06, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/26, C12M1/40,
G01N27/30, G01N27/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

I n t. C I. 7 C12N9/06, C12N15/53, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/26, C12M1/40,
G01N27/30, G01N27/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | Sode K. et al., Screening and characterization of fructosyl-valine-utilizing marine microorganisms, Mar. Biotechnol., 2001, Vol. 3, No. 2, pages 126-32 | 1-25 |
| X | JP 2000-270855 A (早出広司) 2000.10.03, 全文 (ファミリーなし) | 1-25 |
| X | JP 2001-204494 A (早出広司) 2001.07.31, 全文 (ファミリーなし) | 11-25 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 05. 2004

国際調査報告の発送日

15. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 N 3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第1ページ第III欄より続く)

請求の範囲1-10、24-25、及び11-23に共通の事項は、フルクトシルアミン酸化酵素である。

しかしながら、調査の結果、このフルクトシルアミン酸化酵素は、Sode K. et al., Screening and characterization of fructosyl-valine-utilizing marine microorganisms, Mar. Biotechnol., 2001, Vol. 3, pages 126-32に記載されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、フルクトシルアミン酸化酵素は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、この共通事項は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲全てに共通の事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の意味他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲1-10、24-25、及び11-23は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。